ПАРАЗИТОЛОГИЯ, XIV, 2, 1980

УДК 576.893.161.13 : 599.325

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВОГО СОСТАВА И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИКВОРА И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТРИПАНОСОМОЗЕ КРОЛИКОВ

А. Г. Кузовков, А. Ф. Никитин, В. Д. Бадиков

Кафедра биологии и паразитологии, кафедра нормальной физиологии
Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, Ленинград

Описана сравнительная характеристика изменений белков и иммунобиологических свойств ликвора и сыворотки крови у кроликов, зараженных *Trypanosoma ninaekohljakimovae*, в динамике болезни. Изменения белкового состава и иммунобиологических свойств в спинномозговой жидкости и сыворотке отличаются между собой как по степени выраженности, характеру, так и по времени проявления. Изучена зависимость между изменениями иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA сыворотки крови (по данным иммуноэлектрофореза) и ее протективными свойствами. Показано значение барьерных механизмов мозга в формировании иммунитета в центральной нервной системе.

Рядом исследований (Ormerod, Venkatesan, 1971; Seed, Effron, 1973) показано различие морфологических признаков и антигенной структуры трипаносом группы brucei, локализующихся в крови и в мозге теплокровного хозяина.

Можно предположить, что такие различия в морфологии и антигенной структуре трипаносом, локализующихся в мозге и крови, обусловливаются особенностями в характере свойств окружающей их среды и прежде всего особенностями в формировании гуморального иммунитета в центральной нервной системе и на периферии. Известно, что антитела, относящиеся к классам IgM и IgG, имеют особенно важное значение в формировании иммунитета при трипаносомозе (Seed e. a., 1972). В других работах (Mattern, 1968; Masseyeff e. a., 1972) показано, что концентрация этих иммуноглобулинов в спинномозговой жидкости у зараженных африканским трипаносомозом людей значительно ниже, чем в сыворотке крови. По мнению Гринвуда (Greenwood e. a. 1973), такое различие в концентрации IgM в ликворе и сыворотке крови больных людей определяется активностью барьерных механизмов мозга. В этой связи представляют интерес исследования, в которых установлена зависимость между концентрацией иммуноглобулинов IgM и IgG, образующихся в организме мышей в ответ на введение трипаносом, и их биологическим эффектом в отношении последних (Takaynagi, Enuquez, 1973).

Исходя из вышеизложенного, представлялось важным изучить сравнительную характеристику изменений белков и иммунобиологических свойств ликвора и сыворотки крови и установить роль барьерных механизмов мозга в формировании иммунитета в центральной нервной системе при трипаносомозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 56 кроликах. Животных заражали внутрибрюшинным введением $2 \cdot 10^7$ клеток *Trypanosoma ninaekohljakimovae*. Взятие проб крови и ликвора производили на 8-й, 14-й, 20-й, 25-й, 35-й, 45-й, 55-й дни после заражения. Пробы венозной крови получали из мозгового синуса. Забор проб спинномозговой жидкости осуществляли пункцией большой цистерны мозга.

Содержание общего белка в пробах сыворотки и ликвора определяли по методу Лоури (Lowry et., al., 1951). Для фракционирования белков сыворотки и спинномозговой жидкости использовали набор для электрофореза в полиакриламидном геле завода химреактивов «Реанал» (Будапешт).Электрофорез белков крови и ликвора проводили в 7-процентном полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере (pH 8.9) при напряжении 400 в. В колонку вносили 0.01 мл сыворотки крови, разведенной 1 : 1 40-процентным раствором сахарозы. Нативный ликвор вносили в количестве 0.5 мл на колонку. Столбики геля окрашивали 0.5-процентным раствором амидочерного 10 «Б» в 7-процентной уксусной кислоте. Количественную оценку форeграмм проводили с помощью денситометра БИАН-170. При анализе протеинограмм сыворотки и спинномозговой жидкости и их денситометрической оценке мы руководствовались методическими указаниями Добротиной и другие (1974), классификацией Felgenhauer u. a., (1967).

Относительную концентрацию IgM, IgG и IgA в сыворотке крови определяли с помощью метода иммуноэлектрофореза по Afonso в модификации Пясик и др. (1974).

Иммунопроявление фореграмм проводили ослиной сывороткой для иммуноэлектрофореза против белков сыворотки крови кроликов (серия 23, производство ИЭМ им. Гамалеи г. Москва). Расшифровку иммунофореграмм осуществляли с учетом методических указаний Пясик и др. (1974). Количественную оценку иммунофореграмм проводили по данным таблицы Ларского (1971), концентрацию каждого индивидуального белка в стандартной сыворотке в нашем случае условно принимали за 100%. В качестве стандарта использовали сыворотку крови, полученную от 19 здоровых кроликов, которую разливали по 1 мл в ампулы и лиофилизировали.

Протективные свойства сыворотки крови и ликвора больных кроликов исследовали с помощью реакции защитного теста на белых мышах (Soltys, 1957, 1964). Сыворотку крови и ликвор, полученные от больных кроликов, в течение 2 ч выдерживали в термостате при температуре +37° и затем 2 дня хранили в холодильнике при температуре +4°.

Материал для заражения мышей готовили непосредственно перед проведением опытов. С этой целью кровь, полученную на высоте паразитемии от белых мышей, разводили фосфатно-буферным физиологическим раствором с 1.5-процентным содержанием глюкозы (pH 8.0) до конечной концентрации ~ 1500 клеток трипаносом в 1 мл раствора. Опытной группе мышей внутрибрюшинно вводили 0.2 мл суспензии трипаносом и одновременно вторым шприцем 0.5 мл сыворотки больных кроликов. Контрольной группе животных после внутрибрюшинной инъекции 0.2 мл суспензии трипаносом вводили 0.5 мл сыворотки крови здоровых кроликов. Кроме этого, для проверки отсутствия способности исследуемой сыворотки больных животных вызывать заражение трипаносомозом, ставили биопробу на белых мышах. О протективных свойствах сыворотки крови судили по продолжительности жизни зараженных мышей в опытной и контрольной группах. Микроскопическое выявление трипаносом в крови и ликворе проводили по методу раздавленной капли.

Функцию гемато-энцефалического барьера оценивали по коэффициенту проницаемости (Штерн, 1935). Коэффициент проницаемости определяли по отношению к альбуминам и постальбуминам.

Полученные результаты обрабатывали по стандартной методике с помощью электронной вычислительной машины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После внутрибрюшинного заражения кроликов первые клинические признаки болезни появлялись, как правило, через две недели. Клиническая картина инвазии характеризовалась истощением, воспалительными, язвенно-некротическими поражениями кожных покровов и половых органов, блефароконъюнктивитом, нарушениями со стороны дыхательного и желудочно-кишечного трактов, анемией. Паразитемия в периферической крови была непостоянной. Какой-либо связи между тяжестью течения заболевания и степенью проявления паразитемии мы не отмечали. В спинномозговой жидкости паразиты в ранний период инвазии не обнаруживались. В соответствии с клиническими проявлениями в течение заболевания нами было выделено три периода: инкубационный (первые две недели с момента заражения), период разгара (14—40-й дни болезни), терминальный период. Все животные погибали через 45—60 дней после заражения.

Сравнительный анализ протеинограмм спинномозговой жидкости и сыворотки крови здоровых кроликов выявил определенные особенности в белковом спектре ликвора по отношению к сыворотке, затрагивающие преимущественно область расположения высокомолекулярных белков. В ликворе по отношению к сыворотке крови отмечалось более низкое относительное содержание белков с высоким молекулярным весом, а также полное отсутствие макроглобулинов: IgM, β — липопротеида.

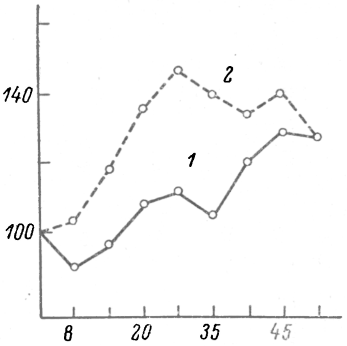

Рис. 1. Изменения содержания общего белка в ликворе (сплошная линия) и сыворотке крови (пунктирная линия) в различные дни болезни.

По оси ординат — содержание общего белка, в % по отношению к контролю, который принят за 100%; по оси абсцисс — дни болезни.

В литературе имеются данные, (Evans e. a., 1966, Weis, Christoff, 1966, Felgenhauer u. a., 1967), что у человека белки с молекулярным весом порядка $6 \cdot 10^5$ и выше переходят из крови в ликвор только при повреждении центральной нервной системы. Наши данные также дают основание полагать, что вышеприведенные различия в электрофоретической картине белков ликвора и сыворотки крови определяются функцией гемато-энцефалического барьера.

Наряду с особенностями белкового состава ликвора и сыворотки крови, зависимыми от функциональной активности гемато-энцефалического барьера, протеинограмма спинномозговой жидкости отличалась от протеинограммы сыворотки крови более высоким относительным содержанием преальбуминов, белков трансферриновой зоны.

Анализ изменений в составе белков ликвора и сыворотки крови в течение заболевания показал, что изменения белкового состава в спинномозговой жидкости и крови отличались между собой по степени выраженности, характеру и времени проявления. Так, если концентрация общего белка в сыворотке крови возрастала уже в первый период инвазии, то увеличение его содержания в ликворе обнаруживалось лишь в терминальный период (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что проявление изменений в концентрации общего белка в сыворотке крови предшествует соответствующим сдвигам в спинно-мозговой жидкости. Как видно из рис. 1, в ранние сроки после заражения выявлялась противоположная направленность в изменениях содержания общего белка в спинномозговой жидкости по сравнению с соответствующими сдвигами в сыворотке. Еще в большей степени эти различия обнаруживались при анализе динамики изменений фракционного состава белков. Как видно из рис. 2, изменения в протеинограмме сыворотки крови (уменьшение концентрации альбуминов, повышение относительного содержания белков постальбуминовой области и области посттрансферринов) предшествовали проявлениям этих изменений в протеинограмме ликвора. Наряду с этим количественные сдвиги в изменении концентрации альбуминов, постальбуминов и посттрансферринов в фореграмме сыворотки крови характеризовались большей степенью выраженности, чем соответствующие изменения в ликворе. Наконец, в ранние сроки заболевания (рис. 2) обнаружилась разнонаправленность изменений в концентрации указанных белков в протеинограмме спинномозговой жидкости и сыворотке крови. Отмеченные особенности также были характерны для динамики изменений абсолютного содержания этих белков (рис. 3).

Оценивая полученные данные, можно предположить, что такое различие в динамике изменений белкового состава ликвора по отношению

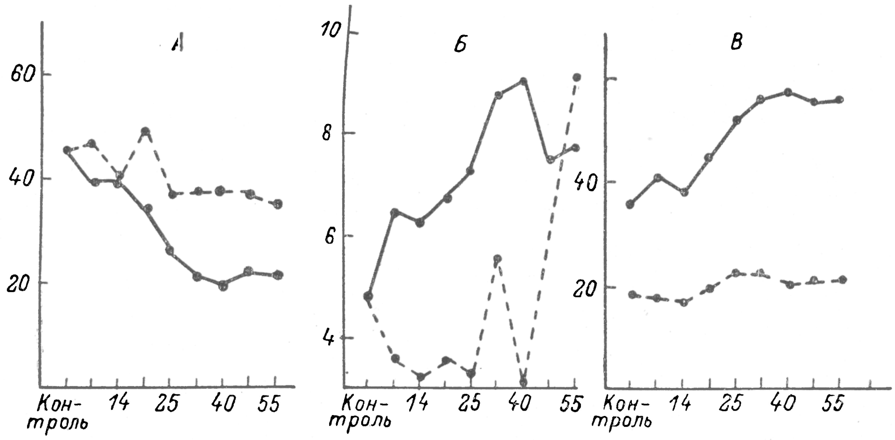

Рис. 2. Изменения относительного содержания альбуминов (*А*), белков зоны постальбуминов (*Б*), белков посттрансферриновой (*В*) зоны ликвора (пунктирная линия) и сыворотки крови (сплошная линия) в различные дни болезни.

По оси ординат — относительное содержание белковых фракций, в %; по оси абсцисс — дни болезни.

к сыворотке крови во многом определяется барьерными механизмами мозга. Действительно, анализ коэффициентов проницаемости мозгового барьера по отношению к альбуминам и постальбуминам выявил причастность этих механизмов к дифференцированным сдвигам в изменениях белкового состава ликвора по отношению к сыворотке крови (рис. 3, *а*, *б*). Как видно, из рис. 3, *а*, проницаемость гематоэнцефалического барьера к альбуминам возрастала в тот период, когда в крови происходило резкое падение концентрации этих белков. Такая реакция мозгового барьера, по-видимому, лежит в основе механизма сохранения баланса альбуминов в ликворе.

Определенная фазность в динамике болезни прослеживалась и в изменении проницаемости гемато-энцефалического барьера по отношению к постальбуминам (рис. 3, *б*). Из рис. 3, *б* видно, что в период разгара болезни, на фоне возрастания концентрации постальбуминов в сыворотке крови, проницаемость гемато-энцефалического барьера к этим белкам резко снижалась, что и обусловливало падение содержания постальбуминов в спинномозговой жидкости. В свою очередь, повышение проницаемости гемато-энцефалического барьера к постальбуминам в терминальный период болезни лежит в основе увеличения их концентрации в спинномозговой жидкости. Особенно четко причастность барьерных механизмов мозга к изменениям белкового состава ликвора выявлялась при анализе соотношений в сдвигах высокомолекулярных белков ликвора и сыворотки крови. Так, если в сыворотке крови концентрация IgM резко возрастала уже в первый период инвазии, то в ликворе этот макроглобулин отсутствовал в течение всего периода болезни. Наконец, о роли барьерных механизмов мозга в изменениях белкового состава спинномозговой жидкости свидетельствует и тот факт, что первоначально качественные сдвиги (появление новой фракции белка, локализующейся в непосредственной близости от катодного конца белков трансферриновой зоны) обнаруживались лишь в протеинограмме сыворотки крови и спустя 10—15 дней они наблюдались в ликворе.

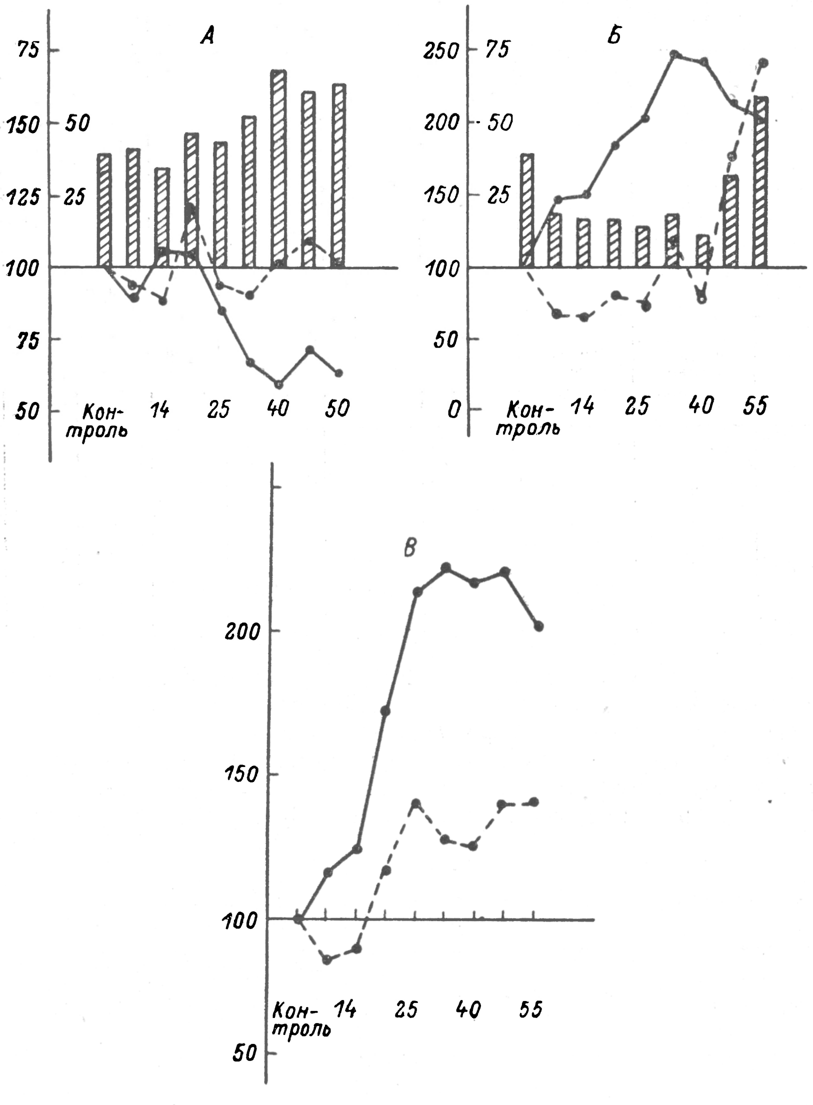

Рис. 3. Изменения абсолютного содержания альбуминов (*А*), белков зоны постальбуминов (*Б*), белков посттрансферриновой (*В*) зоны ликвора (пунктирная линия), сыворотки (сплошная линия) и проницаемости гемато-энцефалического барьера (столбики) в различные дни болезни.

По оси ординат: слева — абсолютное содержание белковых фракций, в % по отношению к контролю, который принят за 100%; справа — для рис. *А*, *Б* — проницаемость гемато-энцефалического барьера. По оси абсцисс — дни болезни.

Сравнение изменений ликвора и сыворотки крови в течение болезни в иммунобиологическом аспекте также выявило определенные особенности в формировании защитных свойств ликвора по отношению к сыворотке (табл. 1, 2). В частности, если защитные свойства сыворотки крови больных кроликов были ярко выражены (у 60% мышей опытной группы продолжительность жизни превышала 3-недельный срок с момента заражения, при 100% гибели в контроле на 6-й день), то спинномозговая жидкость этим свойством не обладала. Отсутствие защитного действия спинномозговой жидкости, по-видимому, определяется более

Таблица 1

Влияние сыворотки крови инвазированных кроликов на продолжительность жизни зараженных мышей в опыте

Условия опыта	Количество кроликов	Количество мышей	Гибель мышей на день опыта: (в % от исходного их количества)						
			5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й	11-й
14-й день									
Контроль	6	34	73.5	100.0	—	—	—	—	—
Опыт	14	43	18.6	18.6	18.6	23.3	23.8	62.9	79.0
35-й день									
Контроль	5	21	86.0	100.0	—	—	—	—	—
Опыт	13	65				12.3	24.6	32.0	38.4

Таблица 1 *(продолжение)*

Условия опыта	Количество кроликов	Количество мышей	Гибель мышей на день опыта: (в % от исходного их количества)						
			12-й	13-й	14-й	15-й	16-й	24-й	30-й
14-й день									
Контроль	6	34	—	—	—	—	—	—	—
Опыт	14	43	100.0	—	—	—	—	—	—
35-й день									
Контроль	5	21	—	—	—	—	—	—	—
Опыт	13	65	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	100.0

низким содержанием в ликворе иммуноглобулинов, и в первую очередь IgM, которые в силу высокого молекулярного веса, вероятно, не могут проникнуть через гемато-энцефалический барьер.

Анализ механизмов изменения белкового состава спинномозговой жидкости и сыворотки крови, позволяет предположить, что отмеченное на ранней фазе заболевания увеличение белков пострансферриновой области в сыворотке крови в значительной мере обусловливается накоплением иммуноглобулинов IgM, IgG. Об этом говорят и данные иммуноэлектрофоретического анализа (табл. 3, рис. 4). Учитывая высокий параллелизм между изменениями концентрации иммуноглобулинов IgM, IgG и выраженностью защитных свойств сыворотки, можно полагать, что наблюдаемые сдвиги в их содержании отражают проявления гуморального специфического иммунитета. Изменения в составе белков спинномозговой жидкости в этот период, очевидно, являются результатом защитной функции барьерных механизмов мозга, направленной на огра-

Таблица 2

Влияние ликвора инвазированных кроликов на продолжительность жизни зараженных мышей в опыте

Условия опыта	Количество кроликов	Количество мышей	Гибель мышей на день опыта: (в % от исходного их количества)		
			4	5	6
14-й день					
Контроль	6	34	—	73.5	100
Опыт	14	26	—	84.5	100
35-й день					
Контроль	5	21	—	86.0	100
Опыт	10	10	—	80.0	100

ничение перехода веществ из крови в цереброспинальную жидкость. Это подтверждается данными о характере проницаемости гемато-энцефалического барьера, которая особенно резко снижается по отношению к низкомолекулярным белкам. О высокой активности барьерных механизмов в период разгара болезни говорит тот факт, что в наибольшей

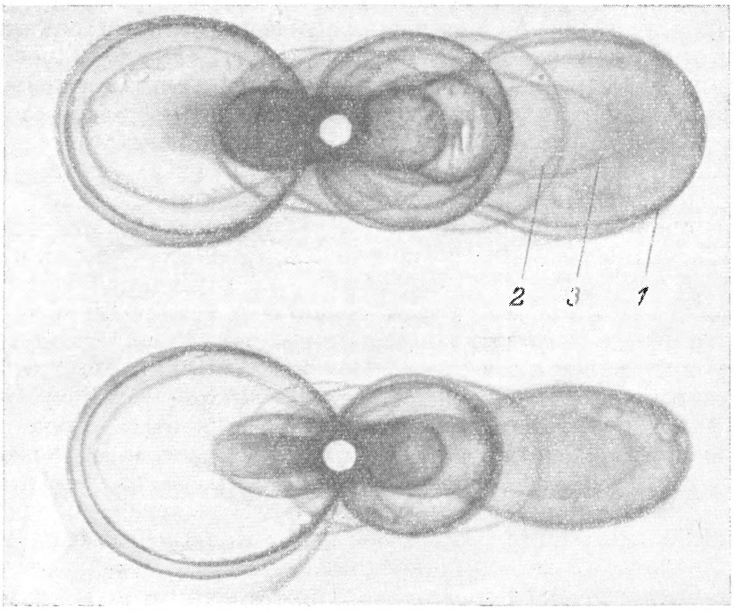

Рис. 4. Иммунофореграмма белков сыворотки крови кролика.

Сверху вниз — на 35-й день после заражения; здорового. *1* — IgG; *2* — IgM; *3* — IgA.

степени различия в изменениях белкового состава ликвора и сыворотки крови в данный период касаются высокомолекулярных белков, по отношению к которым резистентность гемато-энцефалического барьера более всего выражена (Blau e. a., 1963; Weis, Christoff, 1965; Evans, Quick, 1966; Felgenhauer u. a., 1967).

Таблица 3

Изменения концентрации иммуноглобулинов Ig G, IgA, IgM сыворотки крови в различные дни болезни, в % от стандарта

День болезни	IgG	IgA	IgM
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Контроль	107.5±5.8 n — 8	105.3±5.0 n — 9	105.0±9.5 n — 7
14-й день	102.0±12.5 n — 8	56.8±8.9 * n — 8	>250 * n — 7
25-й день	175.0±13.2 * n — 8	50.3±3.3 * n — 8	>250 * n — 7
35-й день	>250 * n — 8	120.4±25.9 n — 8	>250 * n — 7

Примечание. n — количество наблюдений; * — различия статистически достоверны, $p < 0.05$.

В частности, отсутствие в ликворе больных животных IgM, несмотря на резкое увеличение его содержания в сыворотке крови, говорит о том, что порог проницаемости гемато-энцефалического барьера к этому макроглобулину на протяжении болезни не изменяется. Эти данные согласуются с наблюдениями Гринвуд (Greenwood, Whittle, 1973), отмечавших высокую резистентность гемато-энцефалического барьера у больных африканским трипаносомозом. Наконец, подтверждением высокой активности барьерных механизмов мозга в первый и второй периоды инвазии является то, что проявляющиеся в протеинограмме сыворотки крови на 4-й неделе болезни качественные изменения в ликворе обнаруживаются лишь спустя 10-15 дней после этого.

Напротив, увеличение содержания общего белка в спинномозговой жидкости, резкое возрастание концентрации постальбуминов, а равно и появление качественных изменений в протеинограмме ликвора, — все это свидетельствует об ослаблении резистентности мозгового барьера в терминальный период инвазии. На это указывает также повышение проницаемости барьера к низкомолекулярным белкам (постальбуминам).

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что изменения белкового состава и иммунобиологических свойств в спинномозговой жидкости и сыворотке крови в динамике болезни отличаются между собой как по степени выраженности, характеру, так и по времени проявления. Такая дифференцированность изменений белков ликвора по отношению к сыворотке крови во многом определяется активностью барьерных механизмов мозга. В связи с этим можно предположить, что возбудители, находящиеся в ликворе, и паразиты, локализующиеся в крови, будут испытывать различное влияние как со стороны факторов гуморального иммунитета, так и всей суммы свойств, отличающих первую среду от второй. Исходя из концепции академика Е. Н. Павловского об «организме как среде обитания», представляется достаточно обоснованным заключить, что результаты неодинакового влияния различных по своим свойствам сред, таких, как ликвор и кровь, могут по-разному отразиться на биологических свойствах трипаносом и прежде всего, по-видимому, на таких лабильных их признаках, как антигенная структура.

Литература

Добротина Н. А., Ежова Г. П., Горбацевич Е. С. 1974. К вопросу об идентификации и количественном разделении белков сыворотки в полиакриламидном геле. — Лаб. дело, 10 : 590—594.

Ларский Э. Г. 1971. Методы зонального электрофореза. «Медицина», М. : 1—112.

Маттерн П. (Mattern P.) 1968. Современные иммунологические методы и их использование в институте Пастера в Дакаре для диагностики и изучения африканского трипаносомоза у человека. — Бюлл. ВОЗ, 38 (1) : 5—13.

Пясик М. В., Литвиненко Г. В., Ларский Э. Г. 1974. Полуколичественная модификация иммуноэлектрофореза. — Лаб. дело, 5 : 277—280.

Штерн Л. С. 1935. Гемато-энцефалический барьер при нормальных и при патологических условиях. — В кн.: Гемато-энцефалический барьер М.—Л. : 131—139.

Blau J. N., Harris H. H., Robson E. B. 1963. Haptoglobins in cerebrospinal fluid. — Clin. chim. Acta, 8 (2) : 202—206.

Evans J., Quick D. 1966. Polyacrylamide gel electrophoresis of spinal fluid proteins. — Clinical chemistry, 12 (1) : 26—36.

Felgenhauer K., Bach S., Stammler A. 1967. Electrophorese von Serum und Liquor cerebrospinalis in Polyacrilamid.—Gel.— Klin Wschr., 45 (7) : 371—377.

Greenwood B. M., Whittle H. C. 1973. Cerebrospinal-fluid IgM in patients with sleeping-sickness. — Lancet, 7828 : 525—527.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein Measurement with the Folinphenol Reagent. — J. biol. Chem., 193 (1) : 265—275.

Masseyeff R., Blondel J., Mattern P. 1972. Low. molecular weight IgM in the serum and cerebrospinal fluid of patients infected with Trypanosoma gam biense. — Z. Immunitatsforsch., 143 (3) : 291—303.

Ormerod W. E., Venkatesan S. 1971. The occult visceral phase of mammalian trypanosomes with special reference to the life cycle of Trypanosoma (Trapanozoon) brucei — Trans. Roy. Soc. Med. and Hyg., 65 (6) : 722—735.

Seed J. R., Marcus H. R., Risby E. L. 1972. The effect of hydrocortisone on skin lesions, antibody titres and parasitemia in Trypanosoma gambiense infected rabbits. — Amer. J. trop. Med. Hyg., 21 (2) : 150—156.

Seed J. R., Effron H. G. 1973. Simultaneous presence of different antigenic populations of Trypanosoma brucei gambiense in Microtus montanus. — Parasitol., 66 (2) : 269—278.

Soltys M. A. 1957. Immunity in trypanosomiasis. I. Neutralization reaction. — Parasitol., 47 (3—4) : 375—389.
Soltys M. A. 1964. Immunisation of animals with clear trypanosomes. — Parasitol., 54 (3) : 585—591.
Takayanagi T. Z., Enuquez C. L. 1973. Effects of the IgG and IgM immunoglobulins in Trypanosoma gambiense infections in mice. — J. Parasitol., 59 (4) : 644 — 647.
Weis A. H., Christoff N. 1966. The Effect of CSF Paraproteins on the colloidal gold test. — Arch. Neurol., 14 (1) : 100—106.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CHANGES IN THE PROTEIN COMPOSITION AND IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM OF BLOOD DURING EXPERIMENTAL TRYPANOSOMOSIS OF RABBITS

A. G. Kuzovkov, A. F. Nikitin, V. D. Badikov

SUMMARY

Changes in proteins and immunobiological properties of cerebrospinal fluid and serum of blood during trypanosomosis of rabbits infected with *T. ninaekohljakimovae* are described. Changes of the protein composition and immunobiological properties in cerebrospinal fluid and serum have been shown to differ in the degree, character and time of their display. The dependence of changes in the concentration of immunoglobulins IgM, IgG, IgA (according to the data of immunoelectrophoresis) of blood serum on its protective properties was investigated. The role of cerebral barrier mechanisms in the formation of immunity in the central nervous system is shown.